云南植物研究 2007, 29 (5): 559～562
Acta Botanica Yunnanica

# 两株滇产广义美味牛肝菌的分离培养及其分子鉴定[*]

王海坤[1,2]，李　涛[1]，赵丹丹[3]，李凌飞[1]，沙　涛[1]，赵之伟[1**]

(1 云南大学 生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地，微生物多样性可持续利用教育部重点实验室，云南 昆明 650091;
2 昆明师范高等专科学校，云南 昆明 650031；3 云南省农业科学院园艺作物研究所，云南 昆明 650205)

**摘要**：采用组织分离法从广义美味牛肝菌子实体分离获得 2 株稳定的菌株，初步研究了两菌株的分离和培养条件。用 ITS 序列分析，对分离菌株进行了分子鉴定。基于 ITS 序列构建的系统树表明两株菌属于美味牛肝菌复合群，并与夏生牛肝菌 *Boletus aestivalis* (Paul.) Fr. 有较近的亲缘关系。

**关键词**：美味牛肝菌；分离培养；分子鉴定

**中图分类号**：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700 (2007) 05-559-04

# Cultivation and Molecular Identification of Two Bolete Strains Isolated from *Boletus edulis* Complex of Yunnan, China[*]

WANG Hai-Kun[1,2], LI Tao[1], ZHAO Dan-Dan[3], LI Ling-Fei[1],
SHA Tao[1], ZHAO Zhi-Wei[1**]

(1 *Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources*, *and Key Laboratory for Microbial Resources of Minitry of Education*, *Yunnan University*, Kunming 650091, China; 2 *Kunming Teachers College*, Kunming 650031, China;
3 *Institute of Horticulture of Yunnan Academy of Agricultural Sciences*, Kunming 650205, China)

**Abstract:** Two bolete strains were obtained from fruiting bodies by tissue isolation and culture methods. Conditions for isolation and cultivation of the two strains were studied. Molecular identification was carried out based on sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITS1-5.8S-ITS2) of the strains. Neighbour-joining analysis showed that the two isolates belong to the *Boletus edulis* complex and have a close phylogenetic relationship to *B. aestivalis*.

**Key words:** *Boletus edulis*; Isolation and culture; Molecular identification

云南是全球野生食用菌最为丰富的地区之一，尤其是牛肝菌资源 (臧穆, 2006)。牛肝菌是一类著名的食用真菌，目前认为它们是一类与栎和松树等树种根系共生形成外生菌根的真菌类群，迄今为止，除个别种有人报道在实验室条件下栽培成功外 (Ohta and Fujiwara, 2003)，绝大多数种类尚不能通过人工栽培形成子实体 (黄年来, 1998)。在云南，可食用的牛肝菌主要根据子实体的颜色被通俗地分为“白牛肝”，“黄牛肝”和“黑牛肝”，其中“白牛肝”即广义的“美味牛肝菌”在贸易中占有重要的地位。从分类学上看，广义的美味牛肝菌复合群大致包括以下 5 个种：美味牛肝菌 (*Boletus edulis* Bull.: Fr.)、褐红牛肝菌 (*B. pinophilus* Pilát & Dermek)、铜色牛肝菌 (*B. aereus* Bull.: Fr.)、网纹牛肝菌 (*B. reticulates* Schaeff) 和夏生牛肝菌 (*B. aestivalis* (Paul.) Fr.) (Wang 等, 1995; Salerni and Perini, 2004)，这 5 个种由于子实体形态很相似，仅依据形态学特征进行种的鉴定非常困难 (Leonardi 等, 2005; Mello 等, 2006)。

---

[*] 基金项目：云南省自然科学基金 (2005C003M) 资助课题

[**] 通讯作者：Author for correspondence; E-mail: zhaozhw@ynu.edu.cn

收稿日期：2007-03-05, 2007-06-11 接受发表

作者简介：王海坤 (1974-) 男，博士研究生，主要从事菌根生物学研究。

组织分离法是目前牛肝菌分离的常用方法，研究人员曾从培养基、分离材料、分离环境、培养方法等方面摸索了牛肝菌的分离技术（应国华等，2004；邓百万和陈文强，2004），由于对所分离到的菌株无法人工诱导纯培养菌丝体出菇，因此，所得分离物是否为牛肝菌的纯培养物大多仅依据菌丝萌发速度、菌丝生长状况、菌落形态等特征来确定（于富强等，2003；邓百万和陈文强，2004；应国华等，2004）。分子生物学方法的发展和分子系统进化理论的完善，为对以组织分离获得的菌丝体进行物种的分子遗传学鉴定提供了可能。ITS（Internal transcribed spacer）是核糖体 DNA 中的非编码转录间隔区，属于中度保守区域，其保守性基本上表现为种内相对一致，种间差异比较明显，并且真菌的 ITS 易扩增，这些特点使 ITS 区被广泛应用于外生菌根真菌的分子鉴定（Moor 等，2002；Thomas and Richard，2004）。目前已开展的牛肝菌分子鉴定工作，大都采用子实体作为实验材料（Jarosch and Bresinsky，2000；Leonardi 等，2005；Mello 等，2006），所得到的基因序列为牛肝菌分离培养物的分子鉴定研究提供了令人信服的比对数据。

本研究以云南产广义美味牛肝菌新鲜子实体为材料，通过组织分离方法获得两株稳定的分离培养物，用一对 ITS 通用引物（ITS4-ITS5）对这两株菌进行了 PCR 扩增及序列测定，通过 BLAST 序列搜索，将已知序列与两株菌的序列进行构树，确定了两株菌的系统地位。

## 1　材料与方法

### 1.1　分离材料

“白牛肝”子实体分别于 2005 年 7 月 10 日购自云南省昆明市集贸市场和 2005 年 7 月 17 日采自云南省易门县龙泉镇国家级森林公园松树林下。选取生长健壮、刚破土的新鲜子实体作为分离对象。

### 1.2　培养基

1.2.1　分离培养基：本实验设计了一份供分离菌株用的培养基，命名为“14 号培养基”，具体配方如下：取自然风干的牛肝菌生长的山地土壤、腐殖土和麦麸按 1∶1∶0.2 (w/w/w) 比例混合，加 3 倍自来水，沸水浴浸提 4～5 h，冷却后 4 000 r min 离心 15 min，取上清液。40% 马铃薯浸出液（洗净去皮马铃薯 400 g，切碎加水煮沸 30 min，过滤，滤液加水补至 1 000 mL）。将土壤 - 麦麸浸出液和 40% 马铃薯浸出液按 1∶1（v/v）比例混合，补加 $KH_2PO_4$ 0.1%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，NaCl 0.1%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.3%，谷酰胺 0.1%，甘蔗糖蜜 1%，葡萄糖 2%，琼脂 2%，pH 6.0。然后在温度 121℃、9.8 - 10.8×$10^4$ Pa，灭菌 20 min 后备用。

1.2.2　转接培养基（6 种）分别是：① 14 号培养基；② 马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）：马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 L；③Ⅱ号培养基：葡萄糖 20 g、酵母粉 7 g、黄豆粉 3 g、$KH_2PO_4$ 1 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.5 g 、琼脂 20 g、水 1 L；④ Ⅰ号培养基：马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 g、$KH_2PO_4$ 2 g、水 1 L；⑤ PACH 培养基：$KH_2PO_4$ 1 g，$Na_2M_oO_4 \cdot 2H_2O$ 0.275 mg，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，麦芽糖 5 g，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 g，葡萄糖 20 g，$H_3BO_3$ 0.028 g，维生素 $B_1$ 0.1 mg，$MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 5 mg，琼脂粉 16 g，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.11 mg，Fe EDTA 0.02 g，水 1 L，pH 6.5；⑥ 改良 MMN 培养基：$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 g，麦芽汁（12.7Be°）100 mL，NaCl 0.025 g，葡萄糖 10 g，$KH_2PO_4$ 0.5 g，琼脂粉 16 g，$(NH_4)_2HPO_4$ 0.25 g，维生素 $B_1$ 0.1 mg，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g，1% $FeCl_3$ 1.2 ml，水 1 L，pH 6.5。然后在温度 121℃、9.8 - 10.8×$10^4$ Pa，灭菌 20 min 后备用。

### 1.3　子实体采集、组织分离及转接

于 2005 年 7 月在云南省牛肝菌主产区易门县龙泉镇国家级森林公园松树林下采取“白牛肝”子实体，编号为子实体 1 和子实体 2，采摘后立即用 75% 酒精进行表面消毒，再用无菌刀片从菌柄中间切开，然后用消过毒的刀片与镊子分别切取菌柄与菌盖交界处大小为 0.5 cm×0.5 cm 的组织块接入分离培养基斜面上。子实体 1 所接斜面为 YM-1～YM-5 五支斜面，子实体 2 所接斜面为 YM-6～YM-10 五支斜面，并于当天带回实验室置于 24℃ 下黑暗培养，培养期间每隔 3 天检查一次，除去污染。形成菌落后转接入 6 种转管培养基斜面，每种转接培养基接 2 支，24℃ 下黑暗培养，有菌落形成的斜面用相同培养基再转管 2～3 次。本研究中采自易门供分离的子实体标本保藏于本实验室中国西南野生生物种质资源库（微生物库）中（编号为：YMF1.01501 和 YMF1.01502）。购置市售“白牛肝”子实体后立即带回实验室于当天超净工作台上进行组织分离，分离方法同上。

### 1.4　分子鉴定

1.4.1　DNA 提取　菌丝体的总 DNA 提取参照曾东方等（2001）。

1.4.2　PCR 扩增、测序　利用真菌 ITS 通用引物对（ITS4：TCCTCCGCTTATTGATATGC；ITS5：GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG）（White 等，1990）25 μL 反应体系包括：10×buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ 2 μL，dNTP 1 μL，引物各 1

µL，Tag 酶 0.125 µL，DNA 模板 1 µL，无菌去离子水补足至25 µL。扩增程序：94℃ 5 min；94℃ 30 sec，52℃ 30 sec，72℃ 30 sec，30个循环；72℃ 7 min。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测，EB 染色观察。用 WATSON 胶回收试剂盒回收并纯化扩增的目的片段 DNA。

纯化后的 PCR 产物直接由北京三博志远生物技术有限公司依据四色荧光双脱氧末端终止法原理进行 DNA 序列测序。

**1.4.3　ITS 区段的系统发育分析**　使用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 程序将测序获得的序列对照测序胶图仔细核对，以确保序列的准确性。同时将得到的序列提交到 GenBank 数据库，序列登陆号为：EF646277-EF646278，并通过在线 Blast 工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）从 NCBI 下载 GenBank 等数据库内已知同源序列 26 条作为参考序列，其中包括褐红牛肝菌 7 条序列、美味牛肝菌 6 条序列 、铜色牛肝菌 4 条序列和夏生牛肝菌 6 条序列以及作为外群的褐黄牛肝菌（*B. luridus*，AY278765）1 条。并将不同的 ITS 区段用 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 程序进行排序，并对排序结果进行手工调整，以保证对应碱基的同源性。然后用 PAUP * 4.0b 10 软件（Swofford，2003）进行邻接法（neighbor-joining method）分析，对分枝节点的置信度使用重抽样（Bootstraping）法进行评价，Bootstrap 抽样重复次数为 1000 次。

## 2　结果

### 2.1　分离结果

**2.1.1　"白牛肝"市售子实体分离结果**　接种的 10 支斜面，其中 4 支青霉污染，6 支 30 d 后无生长。

**2.1.2　"白牛肝"野外采集子实体分离结果**　接种的 10 支斜面，30 d 后，2 支未萌发，1 支青霉污染，7 支菌落形态一致，为白色细绒状，从组织块边缘长出，菌丝浓密，生长速度缓慢。

### 2.2　转接结果

将分离到的 7 株菌用 6 种培养基转接，每个处理设两个重复，仅转接出 2 个菌株（YM-4 和 YM-6），它们的生长培养基是 I 号和 II 号，其余菌株均未转接成功。

培养 30 天后，菌株 YM-4 和 YM-6 在 II 号培养基上仅有少量菌丝生长；在 I 号培养基上可形成大量菌丝，菌落形态特征为白色细绒状，与培养基结合紧密，产黄色液滴；菌株 YM-6 产黄棕色色素。用 I 号培养基上连续转接 3 代后，YM-4 和 YM-6 菌丝体性状稳定。因此，本研究中所供试的 6 种培养基中，I 号培养基是最适于"白牛肝"转接的培养基。

### 2.3　PCR 扩增

用真菌 ITS 通用引物 ITS4 和 ITS5 对菌株 YM-4 和 YM-6 进行了 PCR 扩增。结果两个样品都有大小在 750 bp 左右扩增条带。

### 2.4　测序结果及 NJ 树的构建

用测序引物 ITS4 和 ITS5 测序后，均得到清晰的序列信号图。将 YM-4 和 YM-6 测序结果与下载序列构建 NJ 树（图 1）。从系统发育树上可见分离到的 2 个菌株属于美味牛肝菌复合群，与夏生牛肝菌 *B. aestivalis*（Paul .）Fr . 有较近的亲缘关系。

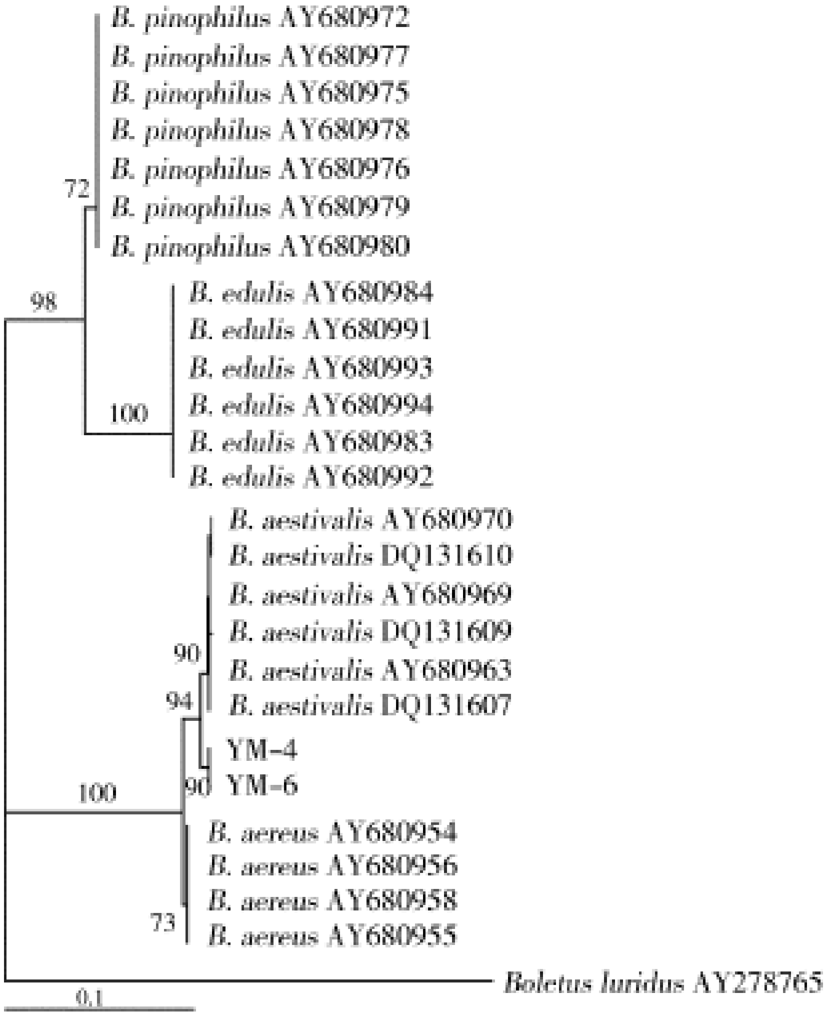

图 1　基于两株滇产广义美味牛肝菌 ITS1-5.8S-ITS2 序列构建的 Neighbour-joining 树

Fig. 1　Neighbour-joining tree based on the ITS1-5.8s-ITS2 sequences from two strains of the *B. edulis* complex of Yunnan，China

## 3　讨论

已有对牛肝菌进行分离成功率为 41.7%～58.3%的报道（于富强等，2003），本研究用 14 号培养基对美味牛肝菌的分离成功率是 70%，说明 14 号培养基较适于美味牛肝菌的分离。在 14 号培养基中，取牛肝菌采集地土壤浸出液作

为分离培养基的成分从而使人工培养基质接近牛肝菌的野外生存营养环境，这可能是成功分离的重要因素之一，但本研究的分离样较小，14号培养基的分离效果还需进一步验证。

牛肝菌子实体采摘后由于其呼吸强度较大而易老化，再加之易受杂菌污染，不易于保藏，24小时后就变暗，本实验从市售“白牛肝”子实体的分离未获成功，可能与这一因素有密切关系。而直接从新鲜子实体上获取组织块的生活力较强，菌丝也较易萌发、生长。因此，采取子实体于当地立即分离是成功分离的又一个重要因素。

在分离得到的7株菌中有2株（YM-4和YM-6）用I号培养基转接3代后，菌丝体性状稳定，其余菌株均未转接成活。用14号培养基不能将分离菌株成功转接，原因可能是在分离培养基上菌丝从组织块边缘萌发长出，与组织块关系密切，转管培养时仅挑取菌丝（不含组织块部分），菌丝脱离组织块后就失去了生长能力。分离菌株YM-4和YM-6在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上未能转接成活，但在此培养基中加入硫酸镁和磷酸二氢钾后就能生长，一月后形成大量菌丝，说明这两种无机盐是培养美味牛肝菌必不可少的。本研究表明I号培养基是最适美味牛肝菌转接的培养基。

有研究用ITS的限制性片段长度多态分析（RFLPs）来进行外生菌根真菌的鉴定（Thomas，2002；Cline等，2005）。但RFLP方法存在操作复杂，多态信息含量低，对样品中靶序列拷贝数的纯度要求高等缺点（沙涛等，2004）。本研究直接将待测菌株的ITS序列扩增测序，通过分子系统进化方法分析待测菌株的分类地位，这种鉴定外生菌根真菌的分子生物学方法更简便、可靠。

## 〔参 考 文 献〕

藏穆，2006. 中国真菌志第22卷，牛肝菌科（I）[M]. 北京：科学出版社

黄年来，1998. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京：中国农业出版社，192

Cline ET, Ammirati JF, Edmonds RL, 2005. Does proximity to mature trees influence ectomycorrhizal fungus communities of Douglas-fir seedlings?[J]. *New Phytol*, **166** (3): 993—1009

Deng BW（邓百万），Cheng WQ（陈文强），2004. Selection of mother media of *Boletus edulis* [J]. *J Fujian Agric Forest Univ* (Nat Sci Ed)（福建农林大学学报（自然科学版）），**33** (3): 396—399

Jarosch M, Bresinsky A, 2000. Identification of dried mushrooms by DNA analysis [J]. *Z Mykol*, **66** (2): 193—200

Leonardi M, Paolocci F, Rubini A *et al*. 2005. Assessment of inter- and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis [J]. *FEMS Microbiol Lett*, **243** (2): 411—416

Mello A, Ghignone S, Vizzini A *et al*. 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes [J]. *J Biotechnol*, **121** (3): 318—329

Moor D, Brodmann P, Nicholas G *et al*. 2002. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of king bolete (*Boletus edulis*) and slippery jack (*Suillus luteus*) in food samples [J]. *Eur Food Res Technol*, **214** (4): 340—345

Ohta A, Fujiwara N, 2003. Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture [J]. *Mycoscience*, **44** (4): 295—300

Salerni E, Perini C, 2004. Experimental study for increasing productivity of *Boletus edulis* s. l. in Italy [J]. *Forest Ecol Manag*, **201** (2-3): 161—170

Sha T（沙涛），Ding HS（丁骅孙），Zhang HB（张汉波）*et al*. 2004. Identification of isolates from fruit bodies of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primer [J]. *Acta Bot Yunnan*（云南植物研究），**26** (5): 524—528

Swofford DL, 2003. PAUP$^*$: Phyligenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b 10 [CP/DK]. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Thomas DB, Richard PS, 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions [J]. *Canad J Bot*, **82** (8): 1122—1132

Thomas RH, 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale [J]. *Plant Soil*, **244** (1-2): 29—39

Wang Y, Sinclair L, Hall IR *et al*. 1995. Boletus edulis sensu lato: a new record for New Zealand [J]. *New Zealand J Crop Hort Sci*, **23**: 227—231

White TJ, Bruns TD, Lee SB *et al*. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ *et al*. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [M]. New York: Academic Press, 315—321

Ying GH（应国华），Lv ML（吕明亮），Chen LQ（陈连庆），2004. A preliminary study on the isolating of *Suillus luteus* [J]. *Forest Res*（林业科学研究），**17** (1): 66—71

Yu FQ（于富强），Ji DG（纪大干），Liu PG（刘培贵），2003. Studies on pure culture of the ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus yunnanensis* [J]. *Bull Bot Res*（植物研究），**23** (1): 66—71

Zeng DF（曾东方），Luo XC（罗信昌），Fu WJ（傅伟杰），2001. Studies on the isolation, culture and DNA identification of mycelia of *Tricholoma matsutake* [J]. *Acta Microbiol Sin*（微生物学报），**41** (3): 278—284